

# 小腸ミクロソーム画分によるグリセリドの分解と コール酸の影響<sup>+</sup>

遠 藤 幸 子  
(栄養学研究室)

## Hydrolysis of Glycerides by the Microsomal Fraction of Mouse Intestine and the Effect of Cholic Acid

Sachiko ENDO

### I. 緒 言

小腸リパーゼに関する研究<sup>1) 2) 3)</sup>においてマウスの小腸リパーゼによる脂肪（主としてトリブチリンとトリオレイン）の分解について実験し、このリパーゼ活性はホモジェネートのミクロソーム画分において最も強いことを明らかにした<sup>3)</sup>。しかし、そのさい残存するグリセリドの性状については追究しなかった。本研究ではその反応後のグリセリドを分画定量し、反応過程および各過程に及ぼす胆汁酸の影響を調べた。

### II. 実験材料および実験方法

#### 1. 実験材料

基質としてはトリオレイン (TO) (東京化成), 1, 2-ジオレイン (DO) およびモノオレイン (MO) (いずれもSigma社, 米国) をもちい, 55%エタノールに溶解して1.13mM溶液とした (前報<sup>3)</sup>の0.1%トリオレイン溶液に相当する)。コール酸 (融点197°C, 鳥取大学医学部生化学教室より供与を受けた) は0.1N水酸化ナトリウムで中和して6.1mM水溶液 (ナトリウム塩) として用いた (前報<sup>3)</sup>の0.25%コール酸溶液に相当する)。

#### 2. 実験方法

1) ミクロソーム画分の調製 30匹の健康雄性成熟マウス (体重16.6~26.9g, 平均21.0g) の小腸 (平均重量0.91g) のホモジェネートから, 前報と同様の方法で行なった。

2) インキュベーション 反応液の組成は表1に示す通りであった。実験 (A), (B), (C) および (D) の反応液 (全量6.0ml) を50mlフラスコにより空气中,

37°Cで20分間インキュベートした。なお, (B) は基質の回収実験として, 反応終了後に基質溶液を加えた。

表1 反応液の組成

添 加 液	実 験			
	(A) 対 照	(B) 回 収	(C) 反 応 コール 酸(-)	(D) 反 応 コール 酸(+)
ミクロソーム画分 (pH7.0)	3.0ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml
1.13mMグリセリド 溶液 a	—	(2.0) <sup>b</sup>	2.0	2.0
55%エタノール	2.0	2.0	—	—
6.1mMコール酸ナ トリウム溶液	—	—	—	1.0
水	1.0	1.0	1.0	—

a : TO, DOあるいはMOの55%エタノール溶液。

b : 反応終了後に加える。

3) グリセリドの抽出, 分離および定量 反応終了後, 直ちに反応液を19倍量のクロロホルム/メタノール (2 : 1, V/V) と充分混合した。この混液をろ過し, そのろ液100mlに0.9%食塩水20mlを加えて振とうした。これを静置して2層に分離したのち, 下層 (クロロホルム) を分取し, 40°C以下で減圧下に蒸発乾固した。この残渣についてカラムクロマトグラフィー (下記) を行なってグリセリドをTO, DOおよびMOの画分に分離し, それぞれ前報<sup>2)</sup>と同様なヒドロキサム酸法によって定量した。この方法による各グリセリドの検量線はいずれも原

<sup>+</sup>小腸リパーゼに関する研究 (第5報)

点を通る直線を示し、測定波長 (500 nm) における分子吸光係数 ( $\times 10^{-3}$ ) はそれぞれ MO : 0.54, DO : 1.01, および TO : 1.52 であった。

以上の方法による実験 (B), (C) および (D) の測定値から対照実験 (A) の測定値を差し引いた値をそれぞれの定量値とした。

#### 4) クロマトグラフィー

i) カラムクロマトグラフィー シリカゲル (40~100 mesh, 半井) 5 g を内径 1.5 cm のクロマトグラフ管に充填したカラムによりグリセリドを分画した。溶媒系は Hirsch<sup>4)</sup>らの方法を一部修正したものである。すなわち、エチルエーテル/石油エーテルを用い、順次 1% エチルエーテル (V/V) 50ml (廃棄), 4% および 8% エチルエーテル 50ml ずつ (以上 TO 画分), 25% エチルエーテル 100ml (DO 画分), エチルエーテル 100ml (MO 画分) で溶出し、流速は毎分約 0.7ml とした。図 1 は TO, DO および MO の混合物のクロマトグラムである。

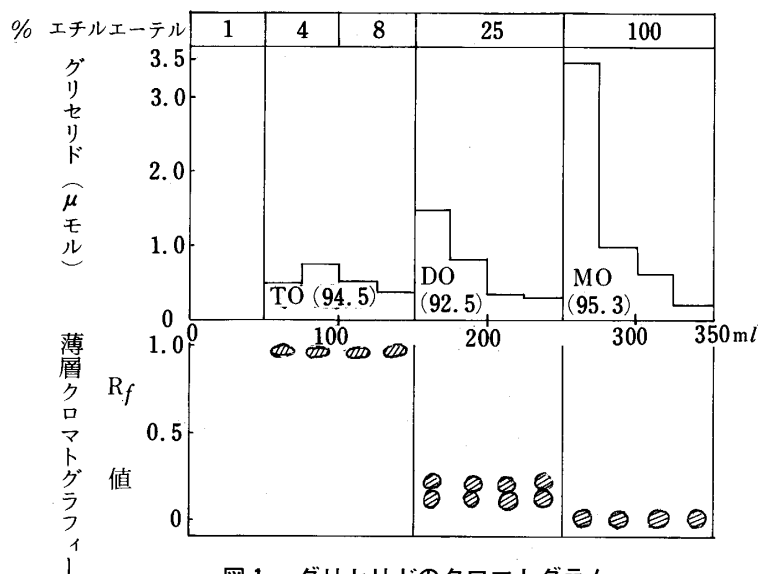


図1 グリセリドのクロマトグラム

MO (5.62μモル), DO (3.23μモル) および TO (2.26μモル) をシリカゲル 5 g を用いエチルエーテル/石油エーテルにより分画。流出液 (25ml) 中のグリセリドの定量と薄層クロマトグラフィー。括弧内の数字は回収率 (%)。

図1に示すようにこの方法によるMO (5.62μモル), DO (3.23μモル) あるいはTO (2.26μモル) の回収率はそれぞれ94.5%, 92.5%, および95.3%であった。また、溶出液について薄層クロマトグラフィーによって調べた各グリセリド相互の分離は満足すべきものであった。なお、使用したDOの標品は薄層クロマトグラフィーによって2つのスポットが検出されたが、全実験を通じてそのまゝ用いた。

なお、インキュベーションにおける定量実験では各グリセリドに相当する画分を一括して集めた。

ii) 薄層クロマトグラフィー Kieselgel G (E. Merck社, ドイツ) 10g を水25mlと混合して4枚のガラス板 (10×20cm) に塗布して薄層板を作製した。風乾後, 110°Cで1時間活性化して使用した。展開溶媒には石油エーテル/エチルエーテル (70:30, V/V) を用い, 展開後リンモリブデン酸/氷酢酸/濃硫酸 (1:20:1, W/V/V)<sup>5)</sup>を噴霧し, 100~110°Cに10分間加熱して淡黄色地色に青色のスポットとしてグリセリドを検出した。

5) 蛋白質の定量 ミクロソーム画分の蛋白質量はビュレット法<sup>6)</sup>により測定し, 蛋白検量線はウシ血清アルブミン (Sigma社, 米国) を用いて作製した。

### III. 実験結果および考察

表2はTO, DO, またはMOを小腸ミクロソーム画分とともにインキュベートし, 反応液中のグリセリドを分画定量して得た成績である。

TOのインキュベーション後のTO, DOおよびMOの合計量には, 反応液中におけるコール酸の存在の有無によって著しい差はなかったが, グリセリドの構成比率は異なるパターンを示した。すなわち, コール酸なしの場合にはTOが最も多く, 次いでDO, MOの順であるのに, コール酸の存在ではTOおよびDOの割合が減少し, MOの割合が増加するパターンが認められた。このことからTOの分解のさいコール酸の存在によってDOを経過してMOまでの分解速度が促進されることが示唆された。

また, TOを基質にした実験における各グリセリドの画分の薄層クロマトグラフィーによる分析結果は図2の通りである。対照実験 (A) (基質としてのTOを含まない反応液のインキュベーション) では, どのグリセリド画分の薄層クロマトグラムでも, 当該グリセリドに相当するスポットは全く検出されなかったのに, TOのインキュベーション実験 (C) および (D) ではそれぞれ該当する画分にTO, DOおよびMOに相当するR<sub>f</sub>値のスポットが検出された。

次に, DOを基質とした場合には, 反応後のグリセリドのうちではDOの残存量が最も多く, 次いでMOであり, わずかながらTOも測定された。このことからDOのMOへの分解とともに一部はTOに合成される反応の存在が推定された。TO, DO, MOの合計量は, コール酸を加えた場合には加えない場合に比べて少なかった。しかし, その構成比率はどちらの場合にも同様なパター

表2 マウス小腸マイクロソーム画分によるグリセリドの分解

TO, DO, またはMO (各2.26 $\mu$ モル) をマウス小腸マイクロソーム画分とともに「実験方法」に記載した条件によりインキュベートし、反応液中のグリセリドを分画定量。数値は3回の実験による平均値。

基質	実験区分	グリセリド ( $\mu$ モル)			計
		TO	DO	MO	
TO	回収試験	1.98*	—	—	—
	コール酸 (—)	0.76 (71.0) <sup>a</sup>	0.23 (21.5)	0.08 (7.5)	1.07 (100)
	コール酸 (+)	0.59 (59.0)	0.11 (11.0)	0.30 (30.0)	1.00 (100)
DO	回収試験	—	2.06**	—	—
	コール酸 (—)	0.10 (9.3)	0.68 (63.6)	0.29 (27.1)	1.07 (100)
	コール酸 (+)	0.10 (11.9)	0.52 (61.9)	0.22 (26.2)	0.84 (100)
MO	回収試験	—	—	2.08***	—
	コール酸 (—)	0.19 (20.2)	0.40 (42.6)	0.35 (37.2)	0.94 (100)
	コール酸 (+)	0.09 (22.0)	0.32 (78.0)	0.00 (0.0)	0.41 (100)

a : 括弧内の数値はグリセリド合計量 (=100) に対する百分比。

\*, \*\*, \*\*\* : 回収率はそれぞれ87.6%, 91.2%, および92.0%。

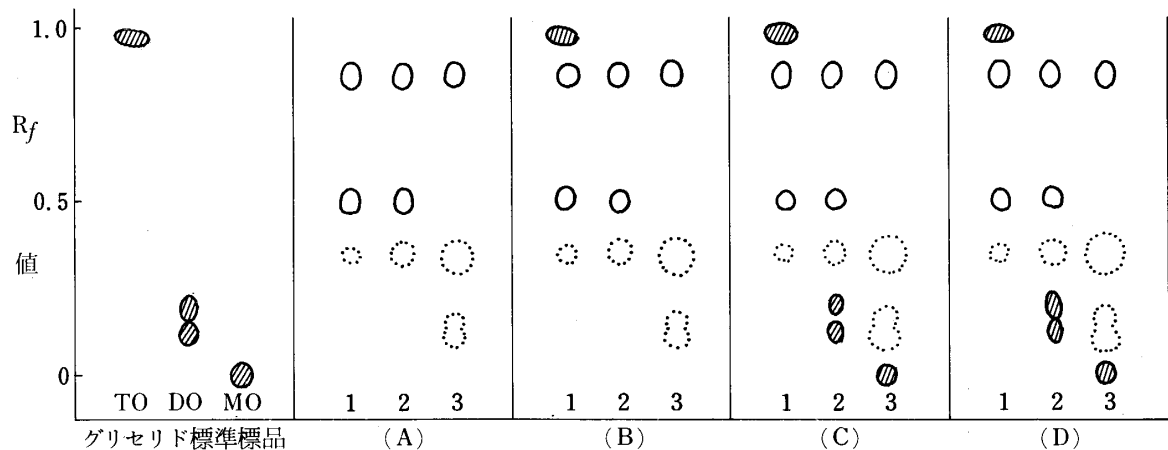


図2 マウス小腸マイクロソーム画分によるTOの分解後のグリセリドの薄層クロマトグラム

基質としてTOを用い、表1の組成の反応液 (A), (B), (C) および (D) の37℃, 20分間のインキュベーション後、カラムクロマトグラフィーによりグリセリドを分画し、各画分を薄層クロマトグラフィーにより分析。1 : TO画分, 2 : DO画分, 3 : MO画分。

スポット : 斜線を施したものは濃青色, 実線のものは淡青色, 点線のものは白 (淡黄色の地色)。

ンを示した。なお、DOを基質とした場合にもTOの場合と同様に、反応生成物のカラムクロマトグラフィーによる各画分を薄層クロマトグラフィーで分析すると、それぞれTO, DOおよびMOに相当するR<sub>f</sub>値を示すスポ

ットが検出された。

次に小腸マイクロソーム画分とともにMOをインキュベートした場合のグリセリドの量についてみると、MOの量に比較してDOの量がやや多く、そしてTOもわずか

ながら測定された。このようにMOのインキュベーションによってDO, TOが増加したことは、この反応系には、MOの分解と共にDO, TOの合成反応も存在することを示唆した。また、MOを基質としたさいコール酸を加えると反応後のグリセリドの合計量は減少し、この場合の残存MOの測定値は、対照実験の測定値より小さく、その定量値は負の値となった。その理由は不明であるが、コール酸によって合成反応が促進されることは認められなかったもので、いずれにしてもコール酸の存在によって小腸ミクロソーム画分によるMOの分解が強く促進されることが示唆された。なお、カラムクロマトグラフィーによって分画した各画分の薄層クロマトグラムにおいてもそれぞれTO, DO およびMOに相当する $R_f$ 値を示すスポットが認められた(コール酸添加時のMOを除く)。

表3 ミクロソーム画分のグリセリド分解活性

表2と同様なインキュベーション実験により、単位蛋白量当りの基質分解量〔回収実験値(B)－残存量(C)または(D)〕を求めた(表1参照)。数値は3回の実験による平均値。

実験区分	基質分解活性( $\mu$ モル/mg蛋白)		
	TO	DO	MO
コール酸(一)	0.30	0.33	0.38
(+)	0.33	0.41	0.56

表3はミクロソーム画分の各グリセリド分解活性を示した成績である。この活性は、コール酸を加えない場合MOに対してもっとも高く、次いでDO, TOの順であった。コール酸を加えた場合には、いずれの基質に対し

ても分解活性の促進がみられ、とくにMOにおいて顕著であった。

#### IV. 要 約

マウス小腸粘膜のミクロソーム画分をもちい、TO, DO,あるいはMOを基質としてインキュベーション実験を行なった。反応後、グリセリドをカラムクロマトグラフィーによりTO, DOおよびMOの画分に分画し、ヒドロキサム酸法によりそれぞれ定量し、また薄層クロマトグラフィーによって各グリセリドを確認した。基質として用いたグリセリドはいずれも小腸ミクロソーム画分によって容易に加水分解を受け、コール酸は一般にその反応を促進する傾向を示した。また、このような加水分解反応のほか、このミクロソーム画分にはモノオレインやジオレインをジオレインおよびトリオレインにエステル化する酵素活性も存在することが認められた。

稿を終るに臨み、本実験に際し御懇篤なる御指導を賜りました鳥取大学医学部小倉道雄教授に深甚な謝意を表しますと共に、実験に御協力いただきました鳥取大学医学部生化学教室の方々に衷心より謝意を表します。

#### 引 用 文 献

- 1) 遠藤幸子：家政学雑誌 18, 94 (1967)
- 2) 遠藤幸子：家政学雑誌 23, 32 (1972)
- 3) 遠藤幸子：家政学雑誌 23, 38 (1972)
- 4) Hirsch, J. and Ahrens, E. H., Jr.: *J. Biol. Chem.*, 233, 311 (1958)
- 5) Usui, T.: *J. Biochem.*, 54, 283 (1963)
- 6) *Method in Enzymology*, Academic Press Inc. Publishers, Vol. 3, 450 (1957)

#### Summary

Hydrolysis of Glycerides by the Microsomal Fraction of Mouse Intestine and the Effect of Cholic Acid

Triolein, diolein, or monoolein was incubated with the microsomal fraction of the intestinal mucosa of mice. Lipids extracted from the incubation mixture were separated by column chromatography on silicic acid into three fractions of tri-, di-, and monoolein. Each glycerides was determined by the hydroxamic method.

The glycerides used as substrate were more or less readily hydrolyzed by the microsomal preparation. Cholic acid tended generally to accelerate the hydrolytic reaction. Besides the hydrolyzing activity, esterifying activity of mono- and diolein to di- and/or triolein was found in this preparation.

(昭和54年1月20日受理)